动 物 学 研 究 2009，Apr. 30(2): 165−170 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.02165

棕点湍蛙皮肤分泌液中促胰岛素释放肽的分离纯化、基因克隆及活性分析

冯 浩[1]，李宗杰[2]，吕 毅[1]，王美娟[1]，李建许[3,*]

(1. 南京农业大学 生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室，江苏 南京 210095；2. 上海应用技术学院，上海 200235；3. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型和人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223)

摘要：通过分离纯化棕点湍蛙(*Amolops loloensis*)皮肤分泌液中的生物活性物质，得到有促胰岛素释放活性的分离峰，并鉴定其结构。采用葡聚糖 Sephadex G-50 凝胶层析和反相高效液相（RP-HPLC）等手段对棕点湍蛙皮肤分泌液进行分离纯化，利用胰岛素释放实验进行活性检测，Edman降解法测定活性峰的氨基酸序列，反转录法构建cDNA 文库并克隆其基因。得到一个具有显著的促胰岛素释放活性的十六肽，测得其氨基酸序列为：FMPIVGKSMSGLSGKL-NH_2，命名为amolopin-1。由cDNA (开放阅读框为 192 bp)推导的氨基酸一级结构显示，其前体由 64 个氨基酸残基(aa)组成，包括高度保守的信号肽(22aa)，酸性肽以及成熟肽。经过数据库序列比对，从棕点湍蛙皮肤中得到一个新的促胰岛素释放肽，进一步分析其作用机理和药代动力学，极有可能得到一个新的治疗糖尿病的降糖药物。

关键词：棕点湍蛙；皮肤分泌液；促胰岛素释放肽；胰岛素分泌
中图分类号：Q959.53；R977.15 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)02-0165-06

Isolation and Molecular Cloning of Insulinotropic Peptide from the Skin Secretions of *Amolops loloensis* and the Study of Its Bioactivities

FENG Hao[1], LI Zong-jie[2] , LV Yi[1], WANG Mei-juan[1] , LI Jian-xu[3,*]

(1. *Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Life Sciences College of Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*; 2. *Shanghai Institute of Technology , Shanghai* 200235, *China*; 3. *Biotoxin Units of Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223,*China*)

Abstract: To investigate the bioactive component from the skin secretion of *Amolops loloensis,* isolated peaks with insulin-releasing activity were purified and structurally determined. Skin secretions were isolated by Gel filtration and Reversed phase high-performance liquid chromatography, and tested with insulin-releasing assay. The amino acid sequence of bioactive peak was determined by Edman degradation and identified by gene clone method. A 16-amino peptide with obvious insulin-releasing activity was obtained and sequenced as FMPIVGKSMSGLSGKL-NH_2 , which was designated amolopin-1. The precursor peptide composed of 64 amino acid residues deduced from cloned skin cDNA (open reading frame 192 bp) exhibited a highly-conserved signal peptide (22aa), an acidic amino acid residue-rich domain and an amolopin-1 encoding domain. Structural alignment with database records revealed that a novel insulinotropic peptide was obtained from skin secretion of *Amolops loloensis* therefore further study of its acting mechanism and pharmacokinetics may lead to the discovery of a new treatment for diabetes.

Key words: *Amolops loloensis*; Skin secretion; Insulinotropic peptide; Insulin release

目前，注射胰岛素仍然是治疗糖尿病最普遍、最有效的治疗方式，但是由于存在低血糖反应、皮肤感染等缺点，研究开发新型降糖药物显得十分迫切。随着对多肽类降糖药物胰高血糖素样肽-1（GLP-1）和源自毒蜥唾液的倍它（exendin-4）等研究工作的不断深入（Kothare et al, 2008）并获得美国食品和药品管理局批准，合成、改造有促胰岛素释放活性的多肽药物已成为治疗糖尿病的新主

收稿日期：2008-10-16；接受日期：2009-01-14
基金项目：云南省重点项目资助（2006C0011Z）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: jxauyhl@yahoo.com.cn
第一作者简介：冯浩，男，硕士研究生，E-mail：fenghao2006@126.com

攻方向之一（Iltz et al, 2007），而且促胰岛素释放肽在降糖的同时还具有降低食欲、减轻患者体重等优点。因此，促胰岛素释放肽有非常广阔的药物开发前景。

两栖类动物皮肤里含有丰富的生物活性多肽资源（Lai et al, 2002a, b），这些活性多肽在调节两栖类皮肤的生理功能、逃避捕食者和抵御微生物感染等方面具有重要作用（Lai et al, 2004;Li et al, 2007）。两栖类皮肤在传统医学中又被称为“蟾壳、蟾蜕”，作为一味珍贵药材治疗多种疾病。近年来，国外学者也相继在两栖类皮肤分泌液中发现了多种有促胰岛素释放活性的多肽（Marenah et al, 2004; Abdel-Wahab et al, 2005; Marenah et al, 2006），为研制新的糖尿病药物提供了极具开发潜力的先导化合物，但是国内从事天然促胰岛素释放肽分离纯化的研究很少。

本研究中所采用的棕点湍蛙收集于云南野外，其皮肤分泌液已被发现含有多种生物活性物质，如抗菌肽(Lu et al, 2006；Wang et al, 2008)、缓激肽(Liang et al, 2006)和致痛肽（Yu et al, 2007）等，说明棕点湍蛙皮肤是发现新型生物活性多肽的极好材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棕点湍蛙（*Amolops loloensis*），来源于云南昭通野外。Sprague Dawley(SD)大鼠，体重200—250g，购于南京青龙山动物繁殖场。Sephadex G-50 为 Amersham Biosciences产品，电泳用试剂均为Sigma产品；实验仪器设备有上海亚荣生化仪器厂生产的2.6cm×100cm层析柱、HL-2B数显恒流泵、BS-100A自动部分收集器，Eppendorf 公司 5810R 高速冷冻离心机，北京六一仪器厂微型垂直电泳槽及电泳仪，上海光谱仪器有限公司751紫外分光光度仪，惠普公司Agillent 1100高效液相色谱仪，大连伊利特Hypersil C18反相柱；其他试剂均为分析纯。

1.2 皮肤分泌液的收集和分离纯化

1.2.1 皮肤分泌液收集方法 成年活体蛙（*n*=30，体重30—40g）用去离子水清洗干净，将其置于带盖的玻璃容器中，滴加适量的无水乙醚，密闭容器1—2min，可见其背部皮肤分泌出泡沫状物质，用含10mmol/L EDTA的0.1mol/L NaCl溶液冲洗，收集冲洗液，离心（12000r/min, 20min）、冷冻干燥、-20℃低温保存。

1.2.2 分离纯化 冻干的棕点湍蛙皮肤分泌物(3.5g，总OD_{280}约300)溶解于10mL含有5mmol/L EDTA的0.1mol/L PBS (pH6.0)中。样品上2.6cm×100cm的Sephadex G-50凝胶过滤柱（经过pH6.0, 0.1mol/L PBS 缓冲液平衡），同时用pH 6.0, 0.1mol/L PBS缓冲液洗脱，用自动部分收集器收集洗脱液；试管收集，每10min一管，每管收集3mL；收集液用紫外－可见分光光度计于280nm测定光吸收值；分别测定各分离峰的促胰岛素释放活性；对有活性的分离峰收集混合，低温冻干后，用2mL的0.1mol/L PBS (pH 6.0)溶解，用反相高效液相色谱法(reverse phase high performance liquid chromatography，RP-HPLC，Hypersil BDS C18，30cm×0.46cm)进一步分离纯化，对HPLC分离峰于 280nm检测光吸收值，收集合并具有促胰岛素释放活性的分离峰。

1.3 结构分析

Edman降解法测定纯品的N端序列（ABI公司产品，脉冲液相测序仪，型号491，由西安华辰生物技术有限公司提供）。

1.4 促胰岛素释放肽的分子克隆

1.4.1 棕点湍蛙皮肤总RNA提取 活体蛙用去离子水清洗干净，双毁髓法处死，取200mg背部皮肤组织置于5mL的玻璃研磨器中，加入1mL总RNA提取液，其他操作步骤参照TRIzol Reagent Total RNA分离试剂盒(购自Invitrogen Life Technologies公司)说明书进行，来提取棕点湍蛙皮肤总RNA。

1.4.2 cDNA文库构建 采用CLONTECH公司 Creator^{TM} SMART^{TM} cDNA Library Construction Kit。利用SMART^{TM} IV Oligonucleotide（5′-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3′）和CDS III/3′ PCR引物（5′-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)30N–1N-3′）合成第一链。利用5′ PCR引物（5′-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3′）和CDS III/3′ PCR引物扩增第二链。

1.4.3 分子克隆 以SMART^{TM}技术构建的cDNA文库作为模板，利用PCR方法克隆促胰岛素释放肽的基因。以Edman降解法测序所得氨基酸序列对应的核苷酸片段设计兼并性引物，扩增引物长度为23个核苷酸，其序列为5'-AT（G/A）CC（T/G）ATC

GT（C/G）CG（A/G）AAG AG（C/T）AT-3′，PCR 另一扩增引物是 SMART^{TM} cDNA Library Construction Kit中的 3′ PCR引物，其序列为 5′-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-3′。PCR 的条件是：(1) 95℃ 5 min；(2)94℃ 30 s, 59℃ 40 s, 72℃ 45 s, 35 轮循环；(3)72℃ 10 min。

1.5　细胞培养

1.5.1　大鼠胰岛细胞的分离纯化与原代培养　胰岛细胞的分离纯化参照Dong et al（1998）的方法并改进。成年SD大鼠经无水乙醚麻醉，消毒, 剖腹, 放血处死；胆总管原位插管, 注入预冷的 1 g/L胶原酶V溶液 8 mL，38℃水浴 10 min，振摇，使呈细沙状；30 目不锈钢丝网过筛；加入冰冷的Hanks液终止消化；洗涤 3 次，加 25% Ficoll适量混匀，依次加入 23%、20%、11% *Ficoll*和*Hanks*液，4℃，3 000 r/min 离心 20 min，吸出 23%—20%，20%—11%界面的胰岛，于RPMI-1640 培养液（含 20%胎牛血清FBS）中培养，37℃，5% CO_2培养过夜。

1.5.2　大鼠胰岛素瘤β细胞系INS-1的培养　INS-1 细胞系于 RPMI-1640 培养液中培养，并添加以下成分：10%胎牛血清 FBS，100 U/mL 青/链霉素，10 mmol/L HEPES，2 mmol/L L-谷氨酰胺，1 mmol/L 丙酮酸钠和 50 μmol/L β-巯基乙醇。2—3 d 换一次培养液，当细胞长至 80% 或长满再进行传代，消化液为 0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA。

1.6　胰岛素释放活性检测

1.6.1　大鼠胰岛的胰岛素释放实验　解剖镜下手工挑选胰岛，置于含KRBB缓冲液（0.1% BSA，无葡萄糖）的 1.5 mL 离心管中，10 个胰岛/管，尽量在 2 h内挑完。加入溶有待测多肽样品的KRBB缓冲液（含 0.1% BSA，16.7mmol/L葡萄糖），37℃ 5% CO_2 孵育 1 h，收集上清液，-20℃冻存，放免法检测胰岛素浓度（Zhang et al, 2001）。

1.6.2　INS-1 细胞系的胰岛素分泌实验　INS-1 细胞用 0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA消化液处理 5 min 后，调整细胞浓度至 3×10^5个/mL，接种于 24 孔细胞培养板，每孔 400 μL，培养过夜使细胞贴壁。胰岛素分泌实验前，吸去上层RPMI-1640 培养液，加入无葡萄糖KRBB缓冲液（含 0.1% BSA）孵育 45 min；然后换已溶有待测多肽样品的 KRBB缓冲液（含 0.1% BSA，2.8 mmol/L葡萄糖），37℃，5% CO_2 孵育 1 h。分别收集上清液，-20 ℃冻存，放免法检测胰岛素浓度（Santini et al, 2004）。

1.7　放免法检测胰岛素含量

碘[^{125}I]-胰岛素（INS）放射免疫分析试剂盒购于北京科美东雅生物技术有限公司，该实验在解放军南京军区总医院放免室进行。根据使标记抗原和抗原与限量抗体发生竞争性结合的原理，先分别加入缓冲液、标准品、质控品和待测样品，然后向每一管中加入标记物 ^{125}I-INS，再加入INS抗体，振荡后 37℃水浴 2.5—3 h，继续加入 1 mL分离剂，充分混匀，室温（15—28℃）下放置 15—20 min。离心前任取两管测量，作为总放射性强度T。3 500 r/min 离心 15 min，立即吸去上清液，在γ计数仪测量各管放射性（测量时间不少于 1 min），用预先编制的程序直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

1.8　统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm SE$ 表示，组间差异采用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析，用 Tukey–Kramer 检验分析显著性差异。

2　结　果

2.1　棕点湍蛙皮肤分泌液促胰岛素释放肽的分离纯化

棕点湍蛙皮肤分泌液上清液在 280 nm处的总 OD_{280}值为 300 左右(图 1A)；经过Sephadex G-50 分离以后，得到有促进胰岛素释放活性的分离峰(图 1A箭头所示)，总OD_{280}为 60 左右；该活性峰经过 RP-HPLC纯化(图 1B箭头所示)，最后得到纯化的促胰岛素释放肽。

2.2　结构特征

本研究首次在棕点湍蛙皮肤分泌液中分离纯化得到促胰岛素释放肽，并将其命名为amolopin-1。该多肽的氨基酸序列用Edman降解法测定，结果表明amolopin-1 由 16 个氨基酸残基组成，序列为 FMPIVGKSMSGLSGKL-NH_2。用ExPASy分析该多肽的MW/pI (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)，结果显示多肽的预测 pI（等量点）为 10.00，预测的分子量为 1 652.04 Da。

2.3　分子克隆

从蛙皮肤组织中得到的总 RNA 中分离出 mRNA，经 cDNA 第一、第二条链的合成，酶切，连接，最后成功地构建了 cDNA 文库。克隆得到促

胰岛素释放肽 amolopin-1 的基因序列见图 2 所示。

2.4 Amolopin-1 对大鼠胰岛的分泌功能的影响

体外培养的胰岛是进行胰岛素释放实验的理想模型。对新分离培养的大鼠胰岛实验表明，与空

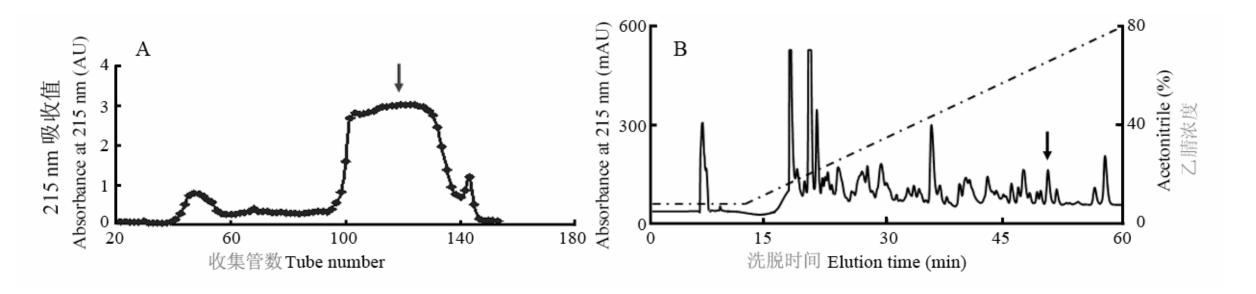


图 1 Sephadex G-50 凝胶过滤(A)和反相高校液相色谱(B)纯化棕点湍蛙皮肤分泌液中促胰岛素释放肽的流程图

Fig. 1 The purification of in sulinotropic peptide from the skin secretions of *Amolops loloensis* by gel filtration (A) and RP-HPLC (B)

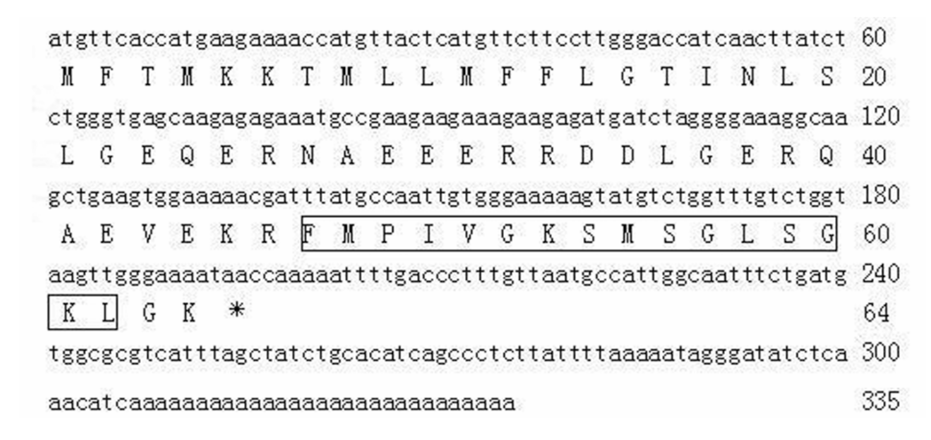


图 2 棕点湍蛙皮肤中编码 amolopin-1 的 cDNA 序列

Fig. 2 The cDNA sequence encoding amolopin-1 from *Amolops loloensis* skin

框中为 amolopin-1 成熟肽序列；*代表终止密码子。

The sequence of mature amolopin-1 is boxed，and the asterisk (*) indicates stop codon.

白组比较，浓度分别为 12.5 μg/mL 和 50 μg/mL amolopin-1 样品组都可以刺激胰岛素释放（16.7 mmol/L 葡萄糖），利用统计学软件分析具有显著差异（图 3，$P < 0.05$）。

2.5 Amolopin-1 对 INS-1 细胞的促胰岛素分泌活性的影响

INS-1 细胞系检验表明，与空白对照相比，促胰岛素释放肽 amolopin-1 可明显地促进 INS-1 细胞分泌胰岛素（图 4）。当样品浓度为 12.5μg/mL 时，其促进活性就已很明显（$P < 0.05$），而且随着样品浓度升高到 50μg/mL 时，INS-1 细胞胰岛素分泌量进一步增加（$P < 0.05$）。

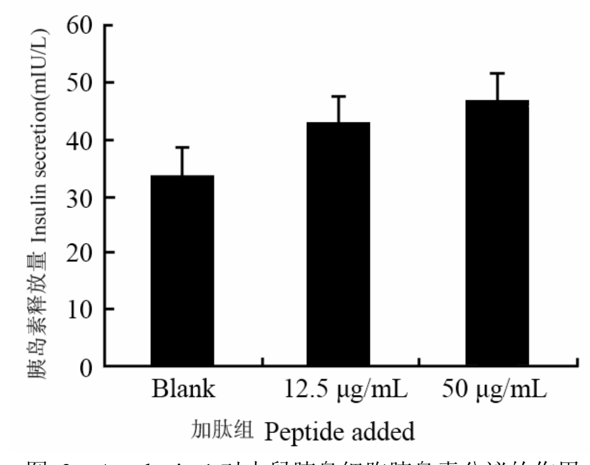


图 3 Amolopin-1 对大鼠胰岛细胞胰岛素分泌的作用

Fig. 3 Effects of amolopin-1 on insulin secretion by rat islets

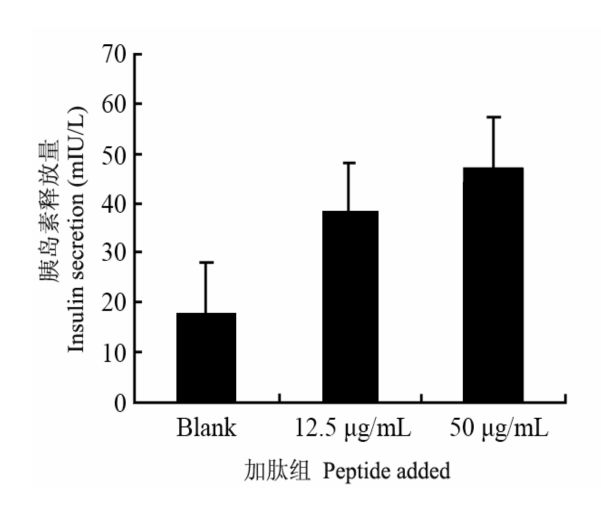


图 4　Amolopin-1 对 INS-1 细胞胰岛素分泌的作用
Fig. 4　The effects of amolopin -1 on insulin secretion by INS-1 cells

3　讨　论

胰岛功能受损后 β 细胞分泌量相对不足或者受体细胞对胰岛素敏感性下降均能引起 2 型糖尿病，约占糖尿病病例总数的 90%，作为一种现代富贵病严重危害人类健康。目前临床正在应用的糖尿病药物有的通过刺激 β 细胞增加胰岛素分泌量；有的通过增加外周组织对胰岛素的敏感性、改善胰岛素抵抗而降低血糖（Bastarrachea et al, 2008）。对 GLP-1 和 exendin-4 等多肽类降糖药物研究发现，促胰岛素释放肽不仅可以治疗胰岛素抵抗，还可以促进胰岛 β 细胞再生和增殖，甚至对磺酰脲类药物治疗失效的患者依然有效，还可以抑制食欲、帮助患者减轻体重（Geelhoed-Duijvestijn, 2007; Guerci et al, 2008）。这些优点使得促胰岛素释放肽受到广泛关注，其全面、稳定的作用效果显示了极大的开发应用价值。

Exendin-4 作为从天然生物体内分离纯化得到的生物活性肽，是首个被发现的 GLP-1 结构类似物（Li et al, 2006），可以与 GLP-1 受体结合起到降糖效果，但现在已发现的天然促胰岛素释放肽也存在一些缺点和不足，如在体内很快被二肽肽酶降解，容易引起患者胃肠不适感等。因此，非常有必要在其他天然生物体内筛选更多类型有促胰岛素释放活性的先导化合物，通过加工、修饰产生能抑制二肽肽酶活性、毒副作用小的新型高效促胰岛素释放肽。在天然药物的基础研究中，如何便捷、大量的获取样品是决定研究进展的瓶颈技术之一。本研究从两栖类动物棕点湍蛙皮肤分泌液中分离得到的促胰岛素释放肽 amolopin-1 是一个十六肽，分子量比 GLP-1 和 exendin-4 都要小得多，更容易通过化学合成的方法得到较多样品作进一步研究。值得注意的是，本研究通过反转录法建立 cDNA 文库成功地克隆了编码 amolopin-1 的基因，而且该基因序列经蛋白质组学分析软件翻译得到的多肽序列与我们 Edman 降解法的测序结果恰好吻合，这表明可以通过现代基因工程的手段高通量表达这一产物。

据文献报道，GLP-1 及其类似物促进胰岛素分泌的作用机制是：通过与胰岛β细胞表面受体相结合，激活腺苷酶C产生第二信使cAMP，进一步活化蛋白激酶A这一信号途径实现的。分别通过原代培养的大鼠胰岛和胰岛素瘤INS-1 细胞系两种实验材料确定amolopin-1 促胰岛素释放的活性后，我们对 amolopin-1 作用机制进行了初探。运用钙离子荧光探针Fluo-3 和激光共聚焦显微镜动态扫描细胞内钙离子浓度$[Ca^{2+}]_i$的变化（数据未在文中列出），发现加入amolopin-1 后没有引起β细胞$[Ca^{2+}]_i$的明显升高，说明amolopin-1 刺激胰岛素分泌的作用机制不是通过引起Ca^{2+}内流实现的。

本研究得到的促胰岛素释放肽 amolopin-1 对 GLP-1 受体是否有激活作用、体内是否有毒性等生理生化特征有待于进一步研究。

参考文献：

Abdel-Wahab YH, Marenah L, Orr DF, Shaw C, Flatt PR. 2005. Isolation and structural characterisation of a novel 13-amino acid insulin-releasing peptide from the skin secretion of *Agalychnis calcarifer* [J]. *Biol Chem*, **386**(8): 581-587.

Bastarrachea RA, Montero JC, Saavedra-Gajardo V, Cerda-Flores R, Machado-Domínguez A, Comuzzie AG. 2008. Molecular targets for new drug discovery to treat type 2 diabetes and obesity [J]. *Rev Med Chil*, **136**(1):107-117.

Dong WP, Zhang HD, Wang YF, Xu JJ, Zhang H, Wang LJ, Hu YF. 1998. Methods for evaluation of the islet graft quality [J]. *Chn J Organ Transplant*, **19**(4): 205-207. [董维平, 张洪德, 王煜非, 徐静娟, 张洪, 王丽娟, 胡远峰. 1998. 胰岛移植物质量鉴定方法的研究. 中华器官移植杂志, **19**(4): 205-207.]

Geelhoed-Duijvestijn PHLM. 2007. Incretins: A new treatment option for type 2 diabetes? [J]. *Neth J Med*, **65**(2): 60-64.

Guerci B, Martin CS. 2008. Exenatide: its position in the treatment of type 2

diabetes [J]. *Ann Endocrinol* (*Paris*), **69**(3): 201-209.

Iltz JL, Odegard PS, Setter SM, Campbell RK. 2007. Update in the pharmacologic treatment of diabetes: Focus on insulin detemir, insulin glulisine, and inhaled dry powdered insulin [J]. *Diabetes Educ*, **33**(2): 215-6, 220, 223-224 passim.

Jones PM, Persaud SJ. 1998. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells [J]. *Endocr Rev,* **19**(4): 429-461.

Kothare PA, Linnebjerg H, Isaka Y, Uenaka K, Yamamura A, Yeo KP, de la Peña A, Teng CH, Mace K, Fineman M, Shigeta H, Sakata Y, Irie S. 2008. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of exenatide in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Pharmacol*, **48**(12): 1389-1399.

Lai R, Zhao Y, Liu H, Zhang YJ, Lee WH, Zhang Y. 2002a. Bioactive substance of amphibian skin and a study on exploitation and utilization of Chinese amphibian resources [J]. *Zool Res,* **23** (1): 65-70.[赖 仞, 赵 宇, 刘 衡, 张玉洁, 李文辉, 张 云. 2002. 两栖类动物皮肤活性物质的利用兼论中国两栖类资源开发的策略. 动物学研究, **23**(1): 65-70.]

Lai R, Zhao Y, Yang DM, Cha HG, Lee WH, Zhang Y. 2002b. Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common chinese amphibians [J]. *Zool Res*, **23**(2): 113-119.

Lai R, Liang JG, Zhang Y. 2004. Antimicrobial peptides in amphibian skins and their application [J]. *Zool Res,* **25**(5): 465-468.[赖 仞, 梁建国, 张 云. 2004. 两栖类皮肤抗菌多肽及其应用. 动物学研究, **25**(5): 465-468.]

Li J, Xu X, Xu C, Zhou W, Zhang K, Yu H, Zhang Y, Zheng Y, Rees HH, Lai R, Yang D, Wu J. 2007. Anti-infection peptidomics of amphibian[J]. *Mol Cell Proteomics*, **6**(5): 882-94.

Li ZJ, Che QL, Yang LP. 2006. Advances in insulinotropic peptides and GLP-1 analogs[J]. *Life Sci Res*，**10**(2): 116-122.[李宗杰, 车巧林, 杨丽萍. 2006. 促胰岛素释放肽和 GLP-1 类似物研究进展. 生命科学研究，**10**(2): 116-122.]

Liang JG, Han YP, Li JX, Xu XQ, Rees HH, Lai R.2006. A novel bradykinin-like peptide from skin secretions of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis* [J]. *Peptides*, **27**: 2683-2687.

Lu Y, Li JX, Yu HN, Xu XQ, Liang JG, Tian YQ, Ma DY, Lin GQ, Huang GQ, Lai R. 2006. Two families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis* [J]. *Peptides*, **27**: 3085-3091.

Marenah L, Shaw C, Orr DF, McClean S, Flatt PR, Abdel-Wahab YH. 2004. Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas* [J]. *Regul Pept*, **120**(1-3): 33.

Marenah L, Flatt PR, Orr DF, Shaw C, Abdel-Wahab YH. 2006. Skin secretions of *Rana saharica* frogs reveal antimicrobial peptides esculentins-1 and -1B and brevinins-1E and -2EC with novel insulin releasing activity [J]. *J Endocrinol*, **188**(1): 1-9.

Santini E, Fallahi P, Ferrari S M, Masoni A, Antonelli A, Ferrannini E. 2004. Effect of PPAR-γ activation and inhibition on glucose-stimulated insulin release in INS-1e cells [J]. *Diabetes*, **53**(3): 79-83.

Wang AL, Wang JY, Hong J, Feng H, Yang HL, Yu XD, Ma YF, Lai R. 2008. A novel family of antimicrobial peptides from the skin of *Amolops loloensis* [J]. *Biochimie*, **90**: 863-867.

Yu HN, Wang X, Liu JZ, Lai R. 2007. A novel algesic peptide derived from skin secretions of the frog *Amolops loloensis* [J]. *J Pept Sci*, **10**: 1002-1006.

Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, AJ.Vidal-Puig, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. 2001. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between Obesity, β cell dysfunction, and type 2 diabetes [J]. *Cell*, **105**: 745-755.